

10/089982

1015 Rec'd PCT/PTO 03 APR 2002

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR00/02766

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of my knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/FR00/02766 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: March 26, 2002



Full name of the translator :

Elaine Patricia PARRISH

For and on behalf of RWS Group plc

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT 00/02766

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K35/56 A61K7/48 A61P17/00 A61P29/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97 24133 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 10 juillet 1997 (1997-07-10) cité dans la demande revendications -----	1-30



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *S* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 avril 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/05/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/02766

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9724133 A	10-07-1997	FR 2743075 A	04-07-1997
		AU 1381697 A	28-07-1997
		CA 2254791 A	10-07-1997
		EP 0869805 A	14-10-1998
		JP 2000504314 T	11-04-2000
<hr/>			





DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 35/56, 38/17, C07K 14/435	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/24133 (43) Date de publication internationale: 10 juillet 1997 (10.07.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/02098 (22) Date de dépôt international: 27 décembre 1996 (27.12.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/15650 28 décembre 1995 (28.12.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LOPEZ, Evelyne [FR/FR]; 23, avenue de la Bourbonnais, F-75007 Paris (FR). GIRAUD, Michel [FR/FR]; Roz Ar C'had, F-29140 Melgven (FR). BERLAND, Sophie [FR/FR]; 6, rue Ningesser et Coli, F-95150 Taverny (FR). MILET, Christian [FR/FR]; 1, rue du Chemin-Noir, F-77140 Saint-Pierre-les-Nemours (FR). GUTIERREZ, Gilles [FR/FR]; 39, rue du Lieutenant-Colonel-Prevost, F-69006 Lyon (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: METHOD FOR PREPARATION OF ACTIVE SUBSTANCES FROM NACRE, RESULTING PRODUCTS, USEFUL IN MEDICINAL APPLICATIONS (54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION DE SUBSTANCES ACTIVES A PARTIR DE LA NACRE, PRODUITS OBTENUS, UTILES NOTAMMENT COMME MEDICAMENTS (57) Abstract <p>This invention relates to a method for preparation of biologically active substances and has the following characteristic features: (a) nacre is reduced to a powder whose grain size is less than approximately 200 μm; (b) it is placed in close contact with an aqueous solvent; (c) at the end of the contact period, the insoluble fraction is separated out to give the aqueous fraction; (d) the solvent of the aqueous fraction is concentrated to separate out the soluble or water-transportable fraction of the nacre, which is made up of biologically active substances with essentially no mineral components. The invention likewise relates to the products obtained by this method, their use for medicinal purposes and the compositions containing them.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne un procédé de préparation de substances biologiquement actives, caractérisé en ce que: a) on réduit de la nacre en une poudre de granulométrie inférieure à environ 200 μm, b) on la met en contact intime avec un solvant aqueux, c) à la fin de la période de contact, on sépare la fraction insoluble de façon à récupérer la fraction aqueuse, d) on concentre le solvant de la fraction aqueuse de manière à récupérer la fraction soluble ou entraînable à l'eau de la nacre qui est constituée des substances biologiquement actives, essentiellement dépourvues de constituants minéraux. Elle concerne également les produits susceptibles d'être obtenus par ce procédé, leur utilisation à titre de médicament et les compositions les contenant.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Malï	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

PROCEDE DE PREPARATION DE SUBSTANCES ACTIVES A PARTIR DE LA NACRE,
PRODUITS OBTENUS, UTILES NOTAMMENT COMME MEDICAMENTS.

La présente invention se rapporte à un procédé de préparation de substances biologiquement actives à partir de la nacre et aux utilisations des produits purifiés pouvant être ainsi obtenus.

Ces produits seront notamment utiles en chirurgie osseuse et notamment en maxillo-faciale ou pour le traitement des pathologies dégénératives du cartilage, mais aussi en dermatologie.

La nacre a été proposée comme matériau de substitution et/ou de régénération osseuse, en particulier en chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale, mais aussi pour la fabrication d'implants dentaires.

Il a en outre été démontré (Lopez et al, Tissue and Cell, 24, 667-679, 1992) que la nacre exerçait à distance des effets ostéoconducteur et ostéogène sur des cellules osseuses in vitro.

Il était donc souhaitable de pouvoir isoler les substances biologiquement actives présentes dans la nacre.

On sait que la nacre, ou aragonite chonchylifère, est une formation minéralisée biogène ; elle est constituée d'une matrice organique de substances fibreuses et non fibreuses représentant environ 1,7% de la masse totale (Taylor et al, Bulletin of the British Museum (Natural history) Zoology. Suppl. 3. 125pp. + 29 Planches, 1969) et de carbonate de calcium cristallisé sous forme d'aragonite. La structure de la nacre présente donc des similitudes avec celle de l'os, qui comprend une matrice organique et une phase minérale, constituée de phosphate de calcium sous forme d'hydroxyapatite. Par contre, environ 50% de la matrice organique de la nacre est soluble.

Des auteurs ont décrit l'extraction de protéines actives sur la formation de l'os, les BMP (ou Bone Morphogenetic Proteins) à partir de la fraction insoluble de la matrice de l'os (Urist et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 : 1828-1832, 1979). Ce procédé fait intervenir une déminéralisation acide qui entraîne des risques de dénaturation des produits d'intérêt.

Bien que la nacre ait été suggérée comme biomatériau depuis longtemps, des protéines analogues aux BMP's, par exemple, n'ont jamais été mises en évidence.

La Demanderesse a maintenant trouvé un procédé permettant de séparer des substances présentant un ensemble de propriétés biologiques particulièrement intéressantes en particulier car il ne comporte pas d'étape dénaturante.

5 C'est pourquoi la présente invention a pour objet un procédé de préparation de substances biologiquement actives à partir de la nacre, caractérisé en ce que :

- a) on réduit de la nacre en une poudre de granulométrie inférieure à environ 200 μm (c'est-à-dire en général de 50 à 150 μm),
- 10 b) on la met en contact intime avec un solvant aqueux, éventuellement additionné de sels,
- c) à la fin de la période de contact, on sépare la fraction insoluble de façon à récupérer la fraction aqueuse,
- d) on concentre le solvant de la fraction aqueuse de manière à
15 récupérer la fraction soluble ou entraînable à l'eau de la nacre qui est constituée des substances biologiquement actives, essentiellement dépourvue de constituants minéraux.

Il s'agit d'un procédé simple à mettre en oeuvre, qui est de préférence réalisé à une température comprise entre environ 4° C et 30°
20 C ; de bons résultats sont obtenus à température ambiante.

La nacre utilisée peut être obtenue à partir de coquilles de mollusques, notamment d'huîtres telles que *Pinctada maxima*. On utilise la nacre brute, débarrassée des autres éléments de coquille riches en calcite ; de préférence, on part de nacre blanche, sinon il faut prévoir une étape
25 d'élimination des pigments.

Il s'agit d'une matière première aisément disponible, dont l'utilisation n'a pas d'impact négatif sur les populations naturelles ; en effet, la plupart de ces huîtres ou autres mollusques nacrés font l'objet d'une aquaculture.

30 De plus, un avantage supplémentaire est donné par le fait que la matière première peut être obtenue à partir de coquilles d'huîtres ayant produit des perles ; en effet, une huître perlière est éliminée du pool productif après avoir produit successivement au maximum 3 perles, alors qu'elle possède une épaisse couche de nacre de qualité excellente (grade
35 A). La présente invention propose donc un débouché supplémentaire pour une utilisation de la nacre en aval de la perliculture.

La nacre peut être utilisée sans décontamination préalable. Les fractions biologiques purifiées, extraites de la nacre, provenant de bivalves grands filtreurs (800 l eau/jour) sont exemptes d'agents pathogènes susceptibles d'être actifs chez l'humain, ce qui constitue une part essentielle du cahier des charges d'un biomatériau implantable, dont l'innocuité, à court et à long terme est une préoccupation majeure actuellement. Cette préoccupation se justifie par le souci de pallier les pathologies graves pouvant se déclarer à la suite de l'utilisation, en chirurgie osseuse par exemple, d'os lyophilisé.

Dans un des modes de mise en oeuvre du procédé la nacre est amenée à une granulométrie comprise entre 50 et 100 μm .

Dans un autre mode de mise en oeuvre, la nacre est réduite en une poudre de granulométrie comprise entre 15 et 50 μm , ce qui permet d'améliorer le rendement, en approchant de la taille de l'unité cristalline.

Dans tous les cas, on procédera d'abord à un concassage suivi d'un meulage, un broyage simple n'étant pas adapté à la consistance du matériau de départ.

Le solvant de l'étape b) peut être choisi parmi l'eau pure, bidistillée ou apyrogène, ou additionnée de sels choisis notamment parmi NaCl ou le chlorhydrate de guanidine.

L'invention a en effet permis de mettre en évidence que les substances responsables de l'activité biologique de la nacre sont hydrophiles ou entraînables à l'eau, en particulier hydrosolubles, et peuvent être extraites dès la première étape du fractionnement, sous réserve de traiter la nacre finement broyée, ce qui en limite le coût de production.

Le produit susceptible d'être obtenu directement par le procédé défini précédemment comprend un mélange de protéines, qui présentent des activités biologiques de stimulation de la prolifération cellulaire, en particulier des ostéoblastes, des chondrocytes, des kératinocytes et des fibroblastes. Ces protéines peuvent être fibreuses ou non. L'invention concerne non seulement le produit ainsi obtenu mais les diverses substances purifiées par fractionnement à partir du produit soluble complet.

Elle comprend notamment des protéines, pouvant être assimilées à des protéines ancestrales, apparentées à la famille des BMP/TGF β (transforming growth factor).

5 Plus particulièrement, l'invention a pour objet une ou des protéines ostéoinductrices non fibreuses susceptibles d'être obtenues à partir de la nacre, et qui présentent les caractéristiques suivantes:

- elle sont solubles dans l'eau ou entraînables à l'eau,
 - elle sont non cytotoxiques,
 - elles augmentent l'activité phosphatase alcaline et la synthèse de
- 10 collagène de type I par les ostéoblastes.

Elle concerne également des séquences nucléotidiques codant pour une telle protéine. Il doit être entendu que de telles protéines, obtenues d'une autre source ou par synthèse in vivo, par des organes ou

15 tissus isolés ou par des cellules en culture sont également comprises dans l'invention, de même que les produits obtenus par synthèse chimique ou par génie génétique.

Le produit biologiquement actif peut être concentré à l'étape d) par dialyse et/ou lyophilisation.

20 Dans une variante du procédé, après l'étape d) on effectue une précipitation par l'éthanol et l'on récupère le culot qui constituera une sous-fraction biologiquement active, les produits restés en solution constituant une autre sous-fraction biologiquement active.

L'étape b) peut notamment être effectuée par mise en suspension de la poudre de nacre dans le solvant aqueux, sous agitation

25 mécanique ; on peut procéder à 4° C pendant 24 heures, mais les durées et les températures peuvent être adaptées, par l'homme du métier, par exemple en fonction de la granulométrie de départ.

Dans un autre mode de réalisation, l'étape b) est effectuée par passage sous pression du solvant à travers la poudre de nacre

30 immobilisée. Cette immobilisation peut par exemple être effectuée par une colonne, de type CLHP, éventuellement en mélange avec des substances de charge permettant une meilleure diffusion du solvant et évitant le compactage de la poudre de nacre.

Les différents produits obtenus selon l'invention sont utiles à titre d'implant ou de médicament, notamment destiné à augmenter la régénération des tissus notamment osseux, cartilagineux ou cutanés.

Les domaines d'application sont multiples et comprennent :

5

* Divers tissus :

- tissus squelettiques : os, cartilages, ligaments, dents, ciment, ivoire et tous les autres,
- tissus cutanés et sous-cutanés,
- 10 - tous les autres.

* Diverses pathologies :

- vieillissement dégénératif, traumatique, tumoral, esthétique et handicaps,
- 15 - infections rhumatologiques dont arthrose, polyarthrite...,
- infections orthopédiques (traumatologiques et à visées correctrices),
- pathologies du métabolisme calcique,
- infections dermatologiques et dermatocosmétologiques,
- 20 - ou autres...

Les produits selon l'invention pourront notamment être utilisés en chirurgie, en radiologie interventionnelle et dans toutes autres techniques de traitement.

25

Divers modes d'application pourront être envisagés par voie générale ou locale, avec visée d'effet action immédiate ou avec visée d'effet action retardée.

- Les produits et protéines selon l'invention peuvent entrer dans des compositions pharmaceutiques. Celles-ci peuvent se présenter
- 30 sous différentes formes telles que : solutions, suspensions, lyophilisats, poudres, gels, pâtes, colles, visqueux, non visqueux, revêtements, enduits, etc.

Elles pourront être utilisées par exemple dans les cas suivants:

- * Pour des interventions sous imagerie
- 5 - restauration osseuse locale (perte de substance) ou diffuse (déminéralisation) ; au niveau du rachis, des membres (os compact, os spongieux), des os plats de la face et de la boîte crânienne, du squelette thoracique ou autres.
- restauration cartilagineuse, disques intervertébraux et surfaces articulaires, suite par exemple à des destructions de type
- 10 arthrosique ou traumatologique ou autres.
- * Traitement des pathologies diverses des tissus squelettiques
- dans tous les cas cités précédemment, en chirurgie classique
- fabrication des greffons osseux "au modèle" en in vitro, par
- 15 stimulation d'ostéoblastes ou de fibroblastes (ostéoinduction).
- * Traitement des pathologies dermatologiques
- par application locale
- par intervention chirurgicale (injection, greffe ou autre...)
- après production in vitro de greffons cutanés
- 20 * Dans les cas d'autogreffe de cellules osseuses, pour contribuer à stimuler et maintenir l'expression phénotypique de cellules humaines formatrices d'os (ostéoblastes) en culture. Ces ostéoblastes autologues sont destinés à être réimplantés sous la forme d'autogreffe.
- * Utilisation "per os" , en vue de la régulation du métabolisme calcique.
- 25 Selon un aspect avantageux, la composition contient en outre un support solide biocompatible ; celui-ci sera dopé par l'addition en quantité définie, des produits biologiquement actifs. La composition pourra être utilisée comme matériau de comblement de façon à pouvoir restaurer le squelette dans les cas de perte et/ou défaut de substance
- 30 osseuse qu'ils soient d'ordre traumatologique, esthétique ou pathologique.

Selon un autre aspect, la composition contient des excipients adaptés pour une administration par voie cutanée. Elle pourra induire la cicatrisation et la régénération cutanée.

L'invention se rapporte également à la production
5 d'anticorps dirigés contre les différentes fractions protéiques biologiquement actives, ces anticorps pouvant être marqués par radioactivité, fluorescence, réactif chromogène ou enzymatiquement.

Elle concerne la production de sondes marquées ou non.

Selon un autre aspect l'invention concerne des kits de
10 diagnostic contenant un anticorps ou une sonde tels que définis précédemment.

Les produits et protéines selon l'invention peuvent entrer dans des compositions cosmétiques, destinées en particulier à lutter contre les effets du vieillissement.

15 Enfin l'invention comprend l'utilisation des substances et protéines hydrosolubles susceptibles d'être extraites de la nacre comme additifs de culture cellulaire, ainsi que des milieux de culture les contenant.

20 Exemple 1 : Extraction

De la nacre de *Pinctada maxima* sous forme de fragments irréguliers (fournie par la société EVM Développement, SARL, 5, rue Capron, 75018 PARIS, SIRET 38348098500019) est lavée à l'eau courante puis
25 par trois passages en eau distillée. Ces fragments sont mis sous forme micronisée, de granulométrie comprise entre 50 et 100 μm . La poudre obtenue est décontaminée aux rayons γ et est extraite, sans déminéralisation préalable, par agitation mécanique à 4° C pendant 24 heures, par de l'eau pure bidistillée ou de l'eau apyrogène ou une solution
30 de NaCl à 25 g/l ou par une solution aqueuse de chlorhydrate de guanidine (pH 7,4). Une fraction soluble est obtenue après filtration sous vide, concentrée par lyophilisation puis dialysée contre de l'eau avec une membrane de 40 mm de diamètre et de 12 000 à 14 000 Daltons de porosité. Une partie de la fraction obtenue est directement lyophilisée. L'autre
35 partie est précipitée par l'éthanol (24 heures à 4° C).

L'ensemble des opérations effectuées est résumé sur le diagramme suivant :

5

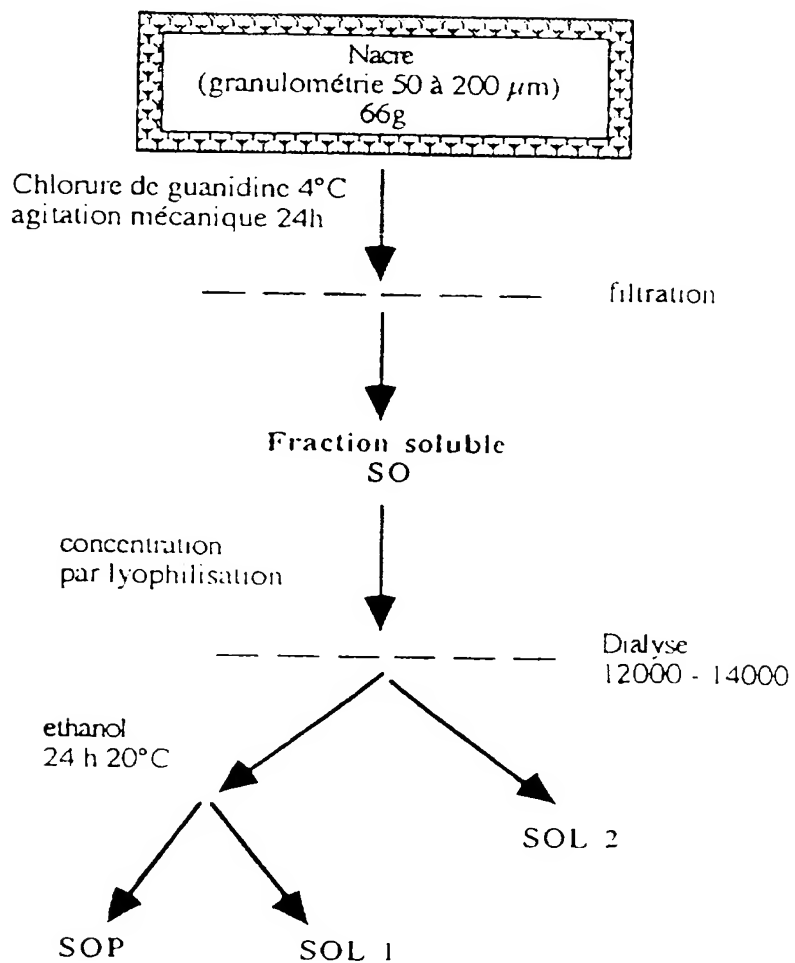
10

15

20

25

30



- Fractionnement, analyse des protéines et des peptides

Les spectres d'absorption en U.V. et l'analyse chromatographique des fractions brutes montrent que ces fractions sont essentiellement de nature protéique ou peptidique.

5 Les étapes principales du fractionnement de la matrice organique en ses divers constituants utilisent, en combinaison, les techniques classiques de chromatographie liquide haute pression (HPLC) et d'électrophorèse. L'exclusion par tailles (SEC), les échanges d'ions (IEX), les interactions hydrophobes (HIC), l'hydroxylapatite (HPHT), la
10 chromatographie d'affinité (AFC) sont les méthodes les plus courantes de HPLC. Ces méthodes sont considérées comme ne dénaturant pas les protéines ou peptides, donc ne provoquant pas d'altération de l'activité biologique.

Les techniques électrophorétiques pour l'analyse des
15 protéines sont l'électrophorèse capillaire de zone à haut pH (CZE), l'électrophorèse analytique et l'électrophorèse préparative. Toutes ces méthodes d'électrophorèse sont hautement résolutive et non dénaturantes.

20 **Exemple 2 : Tests biologiques in vitro**

- Matériel biologique expérimental

Ostéoblastes, chondroblastes, fibroblastes et kératinocytes humains en culture. Cellules de premier passage, provenant d'individus de
25 différents sexes et d'âge variable (enfant - adulte - personne âgée).

- Critères d'évaluation utilisés

1) Cytotoxicité, la prolifération et la migration des cellules est évaluée au moyen du test MTT, technique colorimétrique fondée sur la
30 transformation du sel de tétrazolium (jaune) en un sel de formazan (bleu violet) par la NADPH réductase des cellules vivantes.

2) Stimulation de l'activité des ostéoblastes maintenus à confluence, évaluée par augmentation de la présence et/ou de l'activité phosphatase alcaline.

3) Synthèse de collagène de type I par les ostéoblastes, de type II par les chondrocytes, de type III par les fibroblastes. Ces collagènes, consituants de la matrice extracellulaire peptidique, sont des marqueurs de l'activité de ces types cellulaires.

4) Synthèse de chondroïtine sulfate et d'acide hyaluronique, consituants de la matrice extracellulaire non peptidique sécrétée par les chondrocytes.

5) Fixation de calcium (processus de minéralisation) sur la matrice organique extracellulaire synthétisée par les ostéoblastes (évaluée par spectrophotométrie atomique d'absorption).

6) Synthèse de PTHrp par les kératinocytes.

A titre d'exemple :

Activité des Fractions : test d'activité sur ostéoblastes humains en culture

Extrait	MTT Différence par rapport au témoin	P. Alcaline Différence par rapport au témoin	Collagène Type I Expression
SOP	+	+	+++
SOL 1	+	NS	+++
SOL 2	+	+	++

NS= non significatif

Détermination des composants de la matrice organique
sur extraits :

Immunodétection après électrophorèse et transfert sur membrane
- sur extrait brut -

5

	Collagène type I	Collagène type II	Collagène type III	Décorine	PTIIRp	CGrp
10	+++	++	+	+	+	+

Exemple 3 : In vivo : critères d'évaluation utilisés

15

- Démonstration de l'activité des fractions : le Test de SAMPATH (SAMPATH et al., 1990), utilisé pour la caractérisation de l'activité biologique (ostéoinduction) des Bone Morphogenetic Proteins (BMP) est choisi comme modèle.

20

	Site sous cutané Nacre totale (Poudre)	Collagène type II (1) Immunolocalisation	Collagène type I (2) Immunolocalisation	Phosphatase alcaline (3) Test d'activité
25	1 sem	+	-	-
	2 sem	+	+	+
30	4 sem	-	+	+

1) : spécifique du cartilage

2) : majoritaire dans l'os

3) : activité ostéoblastique

- Démonstration de l'activité sur la régénération cutanée : par application locale sur des lésions (scarifications, brûlures ou autres) provoquées chez l'animal (rat, lapin).

5

Lésion cutanée provoquées (rat)

10

	témoin sham operated	+ application Nacre totale (poudre)
Inflammation chronique	+	-
Cicatrisation à J+2	+/-	+++

15

REVENDICATIONS

5 1. Procédé de préparation de substances biologiquement actives, caractérisé en ce que :

- a) on réduit de la nacre en une poudre de granulométrie inférieure à environ 200 μm ,
- b) on la met en contact intime avec un solvant aqueux,
- c) à la fin de la période de contact, on sépare la fraction insoluble de
10 façon à récupérer la fraction aqueuse,
- d) on concentre le solvant de la fraction aqueuse de manière à récupérer la fraction soluble ou entraînable à l'eau de la nacre qui est constituée des substances biologiquement actives, essentiellement dépourvues de constituants minéraux.

15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'à l'étape a) la nacre est amenée à une granulométrie comprise entre 50 et 100 μm .

20 3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'à l'étape a) la nacre est réduite en une poudre de granulométrie comprise entre 15 et 50 μm .

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'à l'étape b), le solvant est choisi parmi l'eau pure, bidistillée ou apyrogène, ou additionnée de sels choisis notamment parmi NaCl ou le chlorhydrate de guanidine.

25 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'étape d) est effectuée par concentration puis dialyse et/ou lyophilisation.

30 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'après l'étape d) on effectue une précipitation par l'éthanol et l'on récupère le culot qui constituera une sous-fraction biologiquement active.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape b) est effectuée par mise en suspension de la poudre de nacre dans le solvant aqueux, sous agitation mécanique.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape b) est effectuée par passage sous pression du solvant à travers la poudre de nacre immobilisée.

5 9. Produits susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8.

10 10. Protéines ostéoinductrices non fibreuses, analogues des BMPs ou autres, susceptibles d'être obtenues à partir de la nacre, qui présentent les caractéristiques suivantes :

- elles sont solubles dans l'eau,
- 10 - elle sont non cytotoxiques,
- elles augmentent l'activité phosphatase alcaline et la synthèse de collagène de type I par les ostéoblastes.

15 11. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un produit selon la revendication 9 ou une protéine selon la revendication 10.

12. Composition pharmaceutique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle contient en outre un support solide biocompatible.

20 13. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle contient des excipients adaptés pour une administration par voie cutanée.

14. A titre de médicament, produits susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8, ou protéines selon la revendication 11.

25 15. Utilisation d'un produit susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8 ou d'une protéine selon la revendication 9, pour la préparation d'un médicament destiné à augmenter la régénération des tissus notamment osseux, cartilagineux ou cutanés.

30

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que le médicament est utile pour le traitement d'une affection choisie parmi : l'arthrose, la polyarthrite, l'ostéoporose, le vieillissement dégénératif, les pathologies tumorales et les pathologies post-traumatiques telles que pseudoarthrose et algodystrophie.

17. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un produit selon la revendication 9.

18. Milieu de culture de cellules, caractérisé en ce qu'il contient au moins un produit selon la revendication 9 ou une protéine selon la revendication 10.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 96/02098

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K35/56 A61K38/17 C07K14/435

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 715 568 A (VIRASSAMY JOSEPH) 4 August 1995 -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 April 1997

Date of mailing of the international search report

14. 05. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No
PCT/ 96/02098

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2715568 A	04-08-95	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No
PCT/FR 96/02098

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K35/56 A61K38/17 C07K14/435

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 715 568 A (VIRASSAMY JOSEPH) 4 Août 1995 -----	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 Avril 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14.05.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Rempp, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation internationale No
PCT/FR 96/02098

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2715568 A	04-08-95	AUCUN	

Formulaire PCT 15A/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

